Aus der Universitäts-Kinderklinik Hamburg-Eppendorf
(Direktor: Prof. Dr. K. H. Schäfer)

# Experimentelle Studien über den Einfluß von Antikörpern auf die Thrombozyten-Faktor-3-Aktivität von normalen Humanthrombozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Gerhard Tergau
aus Münchehagen

Hamburg 1961

Aus der Universitäts-Kinderklinik Hamburg-Eppendorf
(Direktor: Prof. Dr. K. H. Schäfer)

# Experimentelle Studien über den Einfluß von Antikörpern auf die Thrombozyten-Faktor-3-Aktivität von normalen Humanthrombozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Gerhard Tergau
aus Münchehagen

Hamburg 1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
am: 4. 7. 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Dekan: Professor Dr. R. Prévôt

Referent: Prof. Dr. Schäfer

~~Korreferent:~~

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1. Einleitung und Fragestellung

2. Methodik

   A. Gewinnung und Zubereitung des Anti-Human-thrombozyten-Serums vom Kaninchen.

   B. Thrombozytenfaktor-3-Aktivitätsprüfung mit dem Plasmathrombokinase-Bildungs-Test.

   C. Versuchsanordnung im Hinblick auf die Fragestellung.

3. Ergebnisse

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturangabe

# EINLEITUNG

Bei der chronischen idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (WERLHOF'sche Krankheit) sind von mehreren Autoren gegen die Thrombozyten gerichtete Autoantikörper bzw. autoaggressive Substanzen im Blut dieser Patienten nachgewiesen worden. (EVANS u. DUANE[10]; FISCHER u. LANDBECK[11]; HARRINGTON, SPRAGUE, MOORE, DOUBACH[14]; STEFANINI u. DAMESHEK[26]). Es wird angenommen, daß diese zur Agglutination der Thrombozyten in der Blutbahn, zur Schädigung der Megakaryozyten im Knochenmark (WITTE[27]) und so zur Thrombozytopenie führen. Hinzu findet sich eine wahrscheinlich auch immunologisch bedingte - Gefäßendothelschädigung bei dieser Erkrankung. (ACKROYD[1])

Während zum Nachweis der Autoantikörper in den letzten Jahren zahlreiche Methoden entwickelt wurden, (Übersicht siehe bei MIESCHER u. VORLAENDER[23]) von denen hauptsächlich der direkte Thrombozyten-Coombs-Test hervorzuheben ist, wurde andererseits auch der Gerinnungsfunktion der Thrombozyten dieser Patienten eine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. (BONNIN[5,6,7]; FISCHER u. LANDBECK[11,12]). Dabei stellte sich heraus, daß beim Nachweis von Autoaggressinen regelmäßig eine Verminderung der Faktor-3-Aktivität dieser Thrombozyten vorliegt (SCHÄFER, FISCHER u. LANDBECK [11]). LANDBECK und FISCHER[18] konnten bei mehreren langfristig kontrollierten Fällen mit chronischer idiopathischer thrombozytopenischer Purpura nachweisen, daß das Ausmaß der Faktor-3-Aktivitätsminderung parallel geht mit der Thrombozytenzahl und der Stärke der Reaktion des Coombstests. Während nun aber im direkten Thrombozyten-Coombs-Test höchstens in 60% dieser Fälle (MIESCHER[23]) autoaggressive Substanzen gefunden wurden, was wohl zum großen Teil durch technische Schwierigkeiten bei der Aufbereitung der Thrombozytensuspension zu erklären ist, gelingt es nahezu regelmäßig, bei dieser Erkrankung

eine Faktor-3-Aktivitätsminderung nachzuweisen (SCHÄFER, LANDBECK u. FISCHER[25]; FISCHER u. LANDBECK[12]; LANDBECK u. FISCHER[18]). So konnten diese Autoren bei 21 Patienten mit einer chronischen idiopathischen thrombozytopenischen Purpura in 12 Fällen einen positiven direkten Thrombozyten-Coombs-Test und in allen Fällen eine Faktor-3-Aktivitätsminderung der Thrombozyten feststellen. Bei dieser Faktor-3-Aktivitätsminderung handelt es sich nun um eine echte Faktor-3-Aktivitätsminderung und nicht wie bei der konstitutionellen Thrombopathie v. WILLEBRAND-JÜRGENS lediglich um eine Faktor-3-Freisetzungsstörung (BRAUNSTEINER[8]; DÖRKEN u. LANDBECK[9]; JÜRGENS u. HIEPLER[16]; LANDBECK u. UATHAVIKUL[20]). Sie ist über größere Zeiträume, relativ unabhängig von der Therapie, konstant nachzuweisen und unterscheidet sich damit auch von den Befunden bei den sogn. allergischen Thrombozytopenien (Arzneimittel- und ggf. auch Infektthrombozytopenien), bei denen sie, wenn überhaupt, nur flüchtig gefunden wird (LANDBECK u. SAUER[19]. Danach ist es also sehr wahrscheinlich, daß beim Vorliegen einer konstanten echten Verminderung der Thrombozytenfaktor-3-Aktivität über einen längeren Zeitraum - auch ohne positives Ergebnis des direkten Thrombozyten-Coombs-Tests - eine Autoantikörperthrombozytopenie vorliegt (SCHÄFER, LANDBECK u. FISCHER[25]).

In diesem Sinne sprechen auch die experimentellen Befunde von WENDT[28]: Durch Inkubation von Suspensionen normaler Humanthrombozyten mit echten gegen sie gerichteten Antikörpern(Antihumanthrombozytenserum vom Kaninchen) wurde regelmäßig eine Faktor-3-Aktivitätsminderung erzielt.

Diese verminderten Faktor-3-Aktivitätswerte bei der chronischen idiopathischen thrombozytopenischen Purpura und die gleichsinnigen experimentellen Befunde zeigen die Bedeutung dieser Untersuchungsmethode für die Differentialdiagnose der Thrombozytopenie.

In Fortsetzung der Arbeit von WENDT haben wir nun weitere Untersuchungen über den Einfluß von Antikörpern auf die Faktor-3-Aktivität normaler Humanthrombozyten im Experiment durchgeführt. Es galt dabei die Frage zu beantworten, welchen Einfluß die Inkubationszeit und der Antikörpertiter des Anti-Humanthrombozyten-Serums auf die Faktor-3-Aktivität des Thrombozyten ausübt . Weiter wurde untersucht , welche Wirkung die Antikörper enthaltende , isolierte $\gamma$-Globulinfraktion des Anti-Humanthrombozyten-Serums auf die Thrombozytenfaktor-3-Aktivität hat, um so unspezifische Wirkungen des Serums auszuschließen.

# METHODIK

A. Gewinnung und Zubereitung von Anti-Humanthrombozyten-Serum und normalem Serum vom Kaninchen.

Von menschlichen Blutspendern verschiedener Blutgruppe wurde Venenblut abgenommen und daraus eine Thrombozyten-Suspension (s.u.) hergestellt. Diese Plättchen-Suspension wurde zwei 3500 g schweren Kaninchen in die Ohrvene injiziert. Für eine Injektion wurde aus 16 ccm Blut 2-3 ccm Thrombozyten-Suspension gewonnen. Diese Menge wurde jedem Tier sechsmal hintereinander, jeweils im Abstand von drei Tagen injiziert. Am 8. Tag nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und das Blut abgenommen. Aus dem Serum wurde mit physiologischer Kochsalzlösung eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt und die Titerhöhe der Antikörper mit einer Thrombozyten-Suspension von 200 000/$mm^3$ ermittelt, dabei wurde je ein Tropfen Serum bzw. Serumverdünnung mit einem Tropfen Thrombozyten-Suspension zusammengegeben und der Antikörpertiter nach 10 min langer Inkubation bei 20° C in der feuchten Kammer bestimmt. Es ergab sich bei Serum I vom ersten Kaninchen ein Titer von 64, beim Serum II des zweiten Kaninchens ein Titer von 256. Bis zum Gebrauch wurden die Seren in kleinen Portionen bei -20° C eingefroren und aufbewahrt.

B. Thrombozytenfaktor-3-Aktivitätsprüfung mit dem Plasmathrombokinase-Bildungstest.

a) Prinzip der Untersuchung: Die Faktoren, die zur Bildung der Plasmathrombokinase notwendig sind, werden in einem Ansatz zusammenpipettiert (= Ansatz I). Es sind folgende Faktoren:

IV Calzium
V (Proaccellerin)
VIII (Antihämophiles Globulin A)
IX (Antihämophiles Globulin B)
X (Stuart-Prower-Faktor)
PTA (Plasma-Thromboplastin-Antecedent)
Thrombozytenfaktor 3

Die Aktivität der sich in diesem Ansatz bildenden Plasmathrombokinase wird an einem prothrombin- und fibrinogenhaltigen Substrat (= Ansatz II) geprüft. Die höchste Aktivität, als Gerinnungszeit des Ansatz II gemessen, wird normalerweise nach 4 - 5 Minuten erreicht, sie nimmt dann wieder ab, wahrscheinlich auf Grund von Hemmfaktorenwirkung. Dabei wird im einzelnen folgendermaßen vorgegangen:

aa) Ansatz I

Zu gleichen Teilen werden zusammenpipettiert:

1. $BaSO_4$-adsorbiertes Normalplasma, Verdünnung 1:4. (Es enthält die Faktoren V, VIII, PTA)
2. Normalserum, Verdünnung 1:10. (enthält die Faktoren VII, IX, X, PTA)
3. Thrombozytensuspension, 200 000/$mm^3$ (Thrombozytenfaktor-3-Quelle)
4. $CaCl_2$-Lösung m/40

bb) Ansatz II

Thrombozytenfreies Normalplasma, Verdünnung 1:1 (als Prothrombin- und Fibrinogenquelle)

Sofort nach Zugabe des $CaCl_2$ wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt, und nach jeder vollen Minute Bildungszeit die Plasmathrombokinaseaktivität des Ansatz I am thrombozytenfreien Normalplasma des Ansatz II geprüft, d.h. nach jeder Minute wird die Gerinnungszeit des Reaktionsgemisches aus beiden Ansätzen bestimmt. Dabei werden die Plasma- und Serumfaktoren dadurch konstant gehalten, daß man Plasma und Serum von Blutgesunden verwendet. Jede Abweichung von der normalen Plasmathrombokinase-Bildungszeit kann dann nur durch eine Änderung der Thrombozytenfaktor-3 Aktivität bedingt sein.

Um unter möglichst physiologischen Bedingungen zu arbeiten, modifizierte LANDBECK [11] die Originalmethode des Plasmathrombokinase-Bildungstests von BIGGS und DOUGLAS[4] in folgenden Punkten:

1. Bei der Thrombozytengewinnung wurde als Antikoagulanz

Titriplex III " Merk"(Sequestrene $Na_2$) verwendet, zur Beschleunigung der Erytrozytensedimentation wurde Kollidon (Molekulargewicht 30 000) hinzugefügt, ferner als thrombozytenstabilisierende Substanz Tween 80 benutzt.

2. Um den Thrombozytenzerfall an benetzbaren Oberflächen herabzusetzen,wurde mit silikonierten Glaswaren gearbeitet.

3. Die Thrombozytensuspension wurde auf eine Konzentration von 200 000 Thrombozyten/ $mm^3$ im Phasenkontrastmikroskop eingestellt.

4. Als Faktor V- und VIII-Substrat wurde Natriumcitrat-Venenblut genommen,aus dem durch $BaSO_4$-Adsorbtion die Faktoren II, VII, IX, X eliminiert wurden.

b) Durchführung

1. Herstellung des $BaSO_4$-Plasmas:

Blutentnahme aus der Cubitalvene,Mischung mit einer 3,8% igen Natr. Citric.-Lösung im Verhältnis 10 : 1.

Aufbewahrung im Kühlschrank.Verarbeitung innerhalb der nächsten 3 Stunden.

Plasmagewinnung: Das Citratblut wird 15 min bei 3000 U/min zentrifugiert und das thrombozytenfreie Plasma abgehoben.

Adsorbtion von Faktor II, VII, IX, X mit $BaSO_4$ :

1 ml Plasma + 50 mg $BaSO_4$
3 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubieren,
5 Minuten bei 3000 U/ min zentrifugieren,
Plasma abheben.

Plasmaverdünnung: Mischung von Plasma und Aqua dest. im Verhältnis 1 : 5.

2. Herstellung des Serums:

Lösung von lyophil getrocknetem Humanserum ( Beringwerke) in physiologischer NaCl-Lösung (entspricht einer Normalserumverdünnung von 1 : 10 ). Es wurde dieses

Handelspräparat verwendet,um eine möglichst konstante Aktivität der Serumfaktoren zu haben.

3. Thrombozytenisolierung

Blutentnahme und Weiterverarbeitung mit silikonierten Röhrchen und Pipetten.Verwendung von Titriplex III "Merk" (Sequestrene $Na_2$) als Antikoagulanz und Kollidon " Bayer" (Molekulargewicht 30 000) zur Sedimentationsbeschleunigung der Erythrozyten und Tween 80 zur Stabilisierung der Thrombozyten.

Blutentnahme: Venenblut läßt man aus der Kanüle frei abfließen.Mischung mit der Titriplex-Kollidon-Tween 80-NaCl-Lösung im Verhältnis 9:1.

Thrombozytengewinnung: Spontansedimentation des Blutes im Kühlschrank oder zur Sofortverwendung 15 Minuten bei 1000 U/ min zentrifugieren.Thrombozytenreiches Plasma abpipettieren.Nochmaliges Zentrifugieren des thrombozytenreichen Plasmas ( 5 Min. bei 1000 U/min) zur Beseitigung der restlichen Erythrozyten.Anschließend dreimal "waschen":Zentrifugieren des thrombozytenreichen Plasmas ( 5 Min. bei 3000 U/ min ),resuspendieren der Thrombozyten in 10 ml physiologischer NaCl-Lösung.Nach dem letzten Zentrifugieren resuspendiert man in nur 1 ml physiologischer NaCl-Lösung,um eine genügend konzentrierte Thrombozytensuspension zu erhalten.Zählen der Thrombozyten im Phasenkontrastmikroskop;Einstellung der Suspension auf 200 000 Thrombozyten/$mm^3$.

Es wird sowohl mit intakten wie auch mit lysierten Thrombozyten gearbeitet.Bei den intakten Thrombozyten erfolgt die Freisetzung des Faktors 3 erst während des Gerinnungsvorgangs.Ihre Prüfung gibt also Auskunft über die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten und Freisetzung des Faktors 3 ( visköse Metamorphose),da diese Vorgänge erst durch die ersten Thrombinspuren ausgelöst werden[1;3;21;22]. Durch die Thrombozytenlysierung wird diese Freisetzung vorweggenommen. Der Plasmathrombokinase-

Bildungstest mit lysierten Thrombozyten kann demnach als Maß für ihren Faktor-3-Gehalt angesehen werden.

Die Lysis der Thrombozyten erreicht man durch halbstündiges Einfrieren der Thrombozyten-Suspensionen in einer Tiefkühltruhe bei $-20^{\circ}$ C.

4. Herstellung des Substratplasmas für den Ansatz II:

Blutentnahme und Plasmagewinnung wie bei der Herstellung des $BaSO_4$-Plasmas. Verdünnung 1:1 mit Aqua dest.

5. Bereitung der Ansätze und Versuchsablauf

Ansatz I:

0,2 ml $BaSO_4$-Plasmaverdünnung
+ 0,2 ml Serumverdünnung
+ 0,2 ml Thrombozytensuspension
+ 0,2 ml $CaCl_2$ m/40

Ansatz II:

0,1 ml Substratplasma
+ 0,1 ml Aqua dest. } 6 Röhrchen je Versuchsansatz

Beide Ansätze werden in ein Wasserbad von $37^{\circ}$ C gestellt. Nach dem Hinzugeben von $CaCl_2$ zum Ansatz I wird sofort eine Stoppuhr in Gang gesetzt. Erstmalig nach 1 bzw. 2 Minuten, dann jeweils im Abstand von einer Minute wird in den einzelnen Ansatz II-Röhrchen nacheinander der Gerinnungsvorgang ausgelöst, indem gleichzeitig 0,1 ml vom Ansatz I und 0,1 ml $CaCl_2$ hinzupipettiert werden. Die Gerinnungszeit wird mit einer zweiten Stoppuhr gemessen.

c) Versuchsanordnung im Hinblick auf die Fragestellung

I. Faktor-3-Aktivität normaler Humanthrombozyten.
Um Normalwerte des Plasmathrombokinase-Bildungstest zu erhalten, wurde die Faktor-3-Aktivität normaler Humanthrombozyten geprüft, und zwar sowohl bei intakten wie auch bei lysierten Thrombozyten.

II. Prüfung der Faktor-3-Aktivität nach Inkubation mit Antikörpern.

Die Thrombozytensuspension wurde mit Anti-Humanthrombozyten-Serum vermischt im Verhältnis 1:1. Dann wurde die Faktor-3-Aktivität dieser mit Antikörperseren inkubierten Thrombozyten in folgenden Variationen geprüft.

aa) Intakte Thrombozyten wurden mit Antikörperserum vermischt und die Faktor-3-Bestimmung sofort, d.h. ohne Abwarten einer Inkubationszeit durchgeführt.

Mit dem gleichen Versuchsansatz wurde die Faktor-3-Aktivität nach 3o Minuten langer Inkubationszeit des Thrombozyten-Antikörper-Serum-Gemisches bei 37° C geprüft, um festzustellen, ob die längere Inkubationszeit einen Einfluß auf die Antikörperwirkung hat.

bb) Intakte Thrombozyten wurden mit Anti-Humanthrombozyten-Serum vermischt und 3o Minuten bei 37° C inkubiert. Um eine unspezifische Hemmwirkung des Kaninchenserums soweit wie möglich auszuschalten, wurde das Gemisch nach Ablauf der 1/2stündigen Inkubationszeit zentrifugiert, das Serum verworfen und die Plättchen in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Um die Abhängigkeit der Faktor-3-Aktivität von der Stärke des Antikörpertiters zu untersuchen, wurde mit zwei in ihrem Antikörpertiter unterschiedlichen Kaninchenseren (Serum I und II) gearbeitet.

cc) Intakte Thrombozyten wurden mit der γ-Globulinfraktion (= Antikörperfraktion) der Anti-Humanthrombozytenseren vermischt und 3o Minuten bei 37° C inkubiert. Auch hierbei wurde das Gemisch nach Ablauf der 1/2stündigen Inkubationszeit wieder zentrifugiert, das Serum verworfen und die Plättchen in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Die Herstellung der γ-Globulinfraktion erfolgte nach der Methode von HOREJSI und SMETANA[15]:

1 Teil Serum wird mit 3,5 Teilen 0,4%igem Rivanol versetzt. Nach 1o Minuten tritt eine Ausfällung auf.

Dieser Niederschlag (=$\alpha$-Globulin, $\beta$-Globulin und Albumin ) wird abzentrifugiert und der Überstand ( =$\gamma$-Globulin und Rivanol)abgehoben.Durch Adsorbtion an aktive Kohle und Zentrifugieren wird das Rivanol aus dem Überstand wieder entfernt,so daß er schließlich nur noch die $\gamma$-Globuline enthält.

Auch diese Versuchsreihen,zur Frage,welchen Einfluß die $\gamma$-Globulinfraktion des Antikörperserums auf die Faktor-3-Aktivität hat,wurde mit beiden verschiedentitrigen Kaninchenseren durchgeführt.

dd) Da bei Herstellung der $\gamma$-Globulinfraktion praktisch eine Verdünnung des Serums von 1:4 erfolgte,wurden, um vergleichbare Werte zu erhalten,intakte Thrombozyten mit einer 1:4 Verdünnung der beiden verschiedentitrigen Antikörperseren gemischt.Die Faktor-3-bestimmung wurde auch hierbei nach 30 Minuten langer Inkubation bei 37° C durchgeführt.Danach wurde das Gemisch gleichfalls zentrifugiert,das Serum verworfen und die Thrombozyten in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert.

ee) Neben der Faktor-3-Aktivitätsprüfung bei intakten Thrombozyten wurde auch eine bei lysierten Thrombozyten durchgeführt,um festzustellen,ob auch nach der Lysierung ein Einfluß des Antikörperserums auf die Faktor-3-Aktivität bemerkbar ist.Die lysierten Thrombozyten wurden mit Vollserum,$\gamma$-Globulinfraktion und 1:4 Verdünnung des Anti-Humanthrombozyten-Serums II gemischt und 30 Minuten bei 37° C inkubiert.Diese Gemische wurden nicht zentrifugiert und vom Serum gereinigt,da mit dem Serum der durch die Lysis freigewordene Faktor 3 mitverworfen worden wäre.

ff) Zur Frage einer möglichen unspezifischen Hemmwirkung des Kaninchenserums wurden Kontrollversuche mit normalem Kaninchenserum durchgeführt:Intakte und lysierte Thrombozyten wurden mit dem Vollserum,der $\gamma$-Globulinfraktion und der 1:4 Verdünnung von normalem Kaninchenserum vermischt und 30 Minuten bei 37° C

inkubiert. Bei intakten Thrombozyten wurde nach Ablauf der Inkubationszeit das Suspensionsgemisch zentrifugiert, das Serum entfernt und die Thrombozyten in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert, während dies bei den lysierten Thrombozyten aus den oben genannten Gründen nicht durchgeführt wurde.

# E R G E B N I S S E

Die folgenden Tabellen enthalten die Gerinnungszeiten der einzelnen Plasmathrombokinase-Bildungsteste und ihre zugehörigen Bildungszeiten. In einer Tabelle sind jeweils die Werte von 10 bzw. 6 Bildungstesten enthalten. Eine vollaktive Plasthrombokinase, die nach der Versuchsanordnung der Faktor-3-Aktivität entspricht, entsteht normalerweise nach 3 - 5 Minuten Bildungszeit. Das findet seinen Ausdruck in der dann kürzesten Gerinnungszeiten des Versuches. Bei der Besprechung der Ergebnisse werden nur die Mittelwerte der Gerinnungszeiten, dei denen der Mittelwertfehler angegeben ist, und die zugehörigen Plasmathrombokinase-Bildungszeiten genannt.

## I. Faktor-3-Aktivität intakter und lysierter Normalthrombozyten

Tab.1 Faktor-3-Aktivitätswerte intakter Normalthrombozyten

| Tbz.-Suspension | Bildungszeit in Min. 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr.1 | 22,8 | 16,1 | 13,9 | 14,8 | - | 17,1 | 17,8 | |
| Nr.2 | 16,6 | 12,3 | 12,0 | 14,0 | 15,0 | 15,9 | 16,2 | |
| Nr.3 | 17,7 | 14,1 | 13,5 | 14,2 | 16,2 | 16,5 | 16,8 | |
| Nr.4 | 23,5 | 13,0 | 13,2 | 14,3 | 15,3 | 17,4 | 17,3 | G.Zt.+) in Sek. |
| Nr.5 | 20,1 | 14,2 | 14,1 | 14,6 | 18,4 | 20,2 | 22,9 | |
| Nr.6 | 21,6 | 16,4 | 16,0 | 14,0 | 16,3 | 17,6 | 20,2 | |
| Nr.7 | 17,2 | 13,2 | 13,1 | 13,4 | 15,1 | 16,6 | 18,8 | |
| Nr.8 | 18,4 | 13,2 | 12,9 | 12,9 | 14,0 | 15,9 | 17,4 | |
| Nr.9 | 17,3 | 12,5 | 12,3 | 12,0 | 13,8 | 14,1 | 15,6 | |
| Nr.10 | 14,2 | 12,0 | 12,0 | 13,4 | 14,6 | 17,2 | 19,1 | |

+) Gerinnungszeit

Tab.2 Faktor-3-Aktivitätswerte lysierter Normalthrombozyten

| Tbz.-Suspension | Bildungszeit in Min. 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr.1 | 14,2 | 9,2 | 10,3 | 11,9 | 13,1 | - | 13,6 | |
| Nr.2 | 11,3 | 11,9 | 12,3 | 12,9 | 14,2 | 13,3 | 14,5 | |
| Nr.3 | 12,5 | 12,2 | 13,0 | 13,9 | 15,5 | 16,2 | 17,1 | |
| Nr.4 | 15,9 | 11,6 | 14,2 | 14,8 | 16,0 | 17,6 | 18,9 | G.Zt. |
| Nr.5 | 13,7 | 11,7 | 12,5 | 12,7 | 12,9 | 13,9 | 17,2 | in Sek. |
| Nr.6 | 16,2 | 12,2 | 12,0 | 13,3 | 15,7 | 15,2 | 16,1 | |
| Nr.7 | 15,0 | 10,2 | 11,1 | 12,5 | 13,7 | 14,9 | 16,9 | |
| Nr.8 | 14,2 | 10,8 | 11,1 | 12,2 | 12,5 | 14,0 | 15,9 | |
| Nr.9 | 13,2 | 11,0 | 11,4 | 11,3 | 12,8 | 12,9 | 13,5 | |
| Nr.10 | 11,0 | 11,1 | 12,2 | 14,4 | 14,8 | 15,7 | 16,6 | |

In den Tabellen 1 und 2 sind die einzelen Gerinnungszeiten und die entsprechenden Bildungszeiten von Normalthrombozyten wiedergegeben. Aus den Werten ist ersichtlich, daß die maximale Faktor-3-Aktivität bei intakten Thrombozyten nach 2 - 4 Minuten Bildungszeit, bei lysierten nach 1 - 3 Minuten erhalten wird. Die kürzesten Gerinnungszeiten lagen dabei im Mittel für intakte um 13,1 ± 0,7 Sek., für lysierte Thrombozyten um 11,1 ± 0,9 Sek. (siehe auch Abb. 1)

II. Faktor-3 Aktivität nach Inkubation mit Antikörpern.

a) Faktor-3-Bestimmung intakter Thrombozyten nach Inkubation mit Antikörperserum, wobei zwei verschieden lange Inkubationszeiten eingehalten wurden.

Wurde die Faktor-3-Aktivitäts-Bestimmung sofort nach Zusatz des Antikörperserums zur Thrombozytensuspension, also ohne lange Inkubationszeit abzuwarten, durchgeführt, so ergaben sich bei Bildungszeiten in der 2. - 4. Minute kürzeste Gerinnungszeiten um 18,9 ± 0,6 Sek. Bei den Versuchsreihen, in denen die Thrombozyten vor der Faktor-3-Bestimmung 3o Minuten lang mit dem Antikörperserum inkubiert waren, zeigten sich bei Bildungszeiten von 2 - 3 Minuten kürzeste Gerinnungszeiten von 25,1 ± 0,8 Sek. Beide Male

Tab. 3 Faktor-3-Aktivität von intakten Thrombozyten, die mit Anti-Humanthrombozyten-Serum gemischt wurden. Die Faktor-3-Bestimmung wurde sofort, d.h. ohne Abwarten einer Inkubationszeit, durchgeführt.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 1 | 21,6 | 18,4 | 2o,6 | 23,1 | 26,8 | 28,0) | |
| Nr. 2 | 23,4 | 18,4 | 19,5 | 24,7 | 27,8 | 30,0) | |
| Nr. 3 | 23,2 | 22,5 | 18,8 | 24,9 | 28,3 | 32,0) | G.Zt. |
| Nr. 4 | 18,9 | 18,6 | 24,5 | 25,5 | 27,8 | 28,2) | in Sek. |
| Nr. 5 | 18,4 | 19,1 | 22,6 | 23,5 | 27,8 | 3o,7) | |
| Nr. 6 | 23,o | 19,1 | 21,2 | 22,5 | 26,5 | 28,3) | |
| Nr. 7 | 18,7 | 21,1 | 24,4 | 25,6 | 28,3 | - ) | |
| Nr. 8 | 19,6 | 18,5 | 2o,o | 23,3 | 25,9 | 28,3) | |
| Nr. 9 | 21,6 | 2o,2 | 22,7 | 24,5 | 27,4 | 29,6) | |
| Nr.1o | 2o,3 | 19,6 | 21,o | 23,8 | 26,2 | 28,4) | |

Tab.4 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität intakter Thrombozyten nach 30 min. langer Inkubation bei 37 ° C mit Anti-Humanthrombozyten-Serum

| Tbz.-Sus-pension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr.1 | 28,2 | 24,8 | 25,9 | 27,3 | 30,3 | 34,3 | |
| Nr.2 | 28,4 | 25,1 | 24,8 | 25,8 | 28,7 | 28,6 | |
| Nr.3 | 35,0 | 26,2 | 27,5 | 29,4 | 30,6 | - | |
| Nr.4 | 27,4 | 25,3 | 25,4 | 27,7 | 30,1 | 34,7 | G.Zt. |
| Nr.5 | 29,4 | 24,8 | 24,9 | 28,8 | 31,9 | 34,0 | in Sek. |
| Nr.6 | 35,0 | 24,5 | 26,1 | 29,4 | 32,8 | 33,1 | |
| Nr.7 | 33,0 | 26,8 | 28,5 | 29,1 | 31,2 | 35,1 | |
| Nr.8 | 26,9 | 25,5 | 25,8 | 26,0 | 30,4 | 33,2 | |
| Nr.9 | 28,3 | 24,7 | 26,2 | 28,4 | 28,7 | 30,4 | |
| Nr.10 | 27,5 | 23,9 | 25,6 | 27,9 | 28,1 | 28,7 | |

sind also die Gerinnungszeiten durch die Inkubation mit Antikörperseren gegenüber Normalthrombozyten verlängert, wobei die längere Inkubatioszeit jeweils zu stärkeren Gerinnungszeit-Verlängerungen führte.(s. Abb. 2 )

b) Faktor-3-Aktivität intakter Thrombozyten, die vergleichsweise mit zwei Anti-Humanthrombozyten-Seren sowie mit normalem Kaninchenserum inkubiert wurden.

Tab.5 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von intakten Thrombozyten, die mit dem Antihuman-Thrombozyten-Serum I 30 min. lang bei 37 °C inkubiert und danach wieder vom Serum getrennt wurden.

| Tbz-Sus-pension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr.1 | 28,9 | 26,8 | 24,1 | 24,0 | 25,3 | 25,7 | |
| Nr.2 | 29,2 | 25,6 | 26,0 | 28,2 | 30,3 | 33,3 | |
| Nr.3 | 27,5 | 25,3 | 24,0 | 23,7 | 25,4 | 27,8 | |
| Nr.4 | 24,5 | 27,8 | 24,0 | 25,9 | 26,5 | 27,1 | G.Zt. |
| Nr.5 | 32,9 | 26,9 | 25,5 | 26,4 | 28,2 | 31,8 | in Sek. |
| Nr.6 | 32,6 | 26,5 | 24,3 | 26,5 | 27,1 | 30,7 | |
| Nr.7 | 29,3 | 26,1 | 24,2 | 25,7 | 28,3 | 29,1 | |
| Nr.8 | 31,4 | 25,7 | 24,7 | - | 27,0 | 29,4 | |
| Nr.9 | 30,7 | 26,1 | 24,9 | 26,8 | 26,2 | 29,7 | |
| Nr.10 | 29,7 | 25,3 | 25,9 | 26,1 | 28,2 | 29,3 | |

Bei den mit Anti-Humanthrombozyten-Serum I inkubierten Thrombozytensuspensionen ergaben sich kürzeste Gerinnungszeiten von 24,5 $\pm$ 0,7 Sek., während nach Inkubation mit dem Anti-Humanthrombozyten-Serum II kürzeste Gerinnungszeiten von 28,2 $\pm$ 0,9 Sek. gemessen wurden .

Tab. 6 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität in intakten Thrombozyten, die mit dem Anti-Humanthrombozyten-Serum II 30 Min. lang bei 37° C inkubiert und danach durch Zentrifugieren vom Serum wieder getrennt wurden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 1 | 28,8 | 27,6 | 27,8 | 28,4 | 28,7 | 30,5 | |
| Nr. 2 | 34,0 | 29,7 | 29,4 | 29,7 | 30,6 | 32,1 | |
| Nr. 3 | 35,0 | 29,1 | 28,9 | 29,3 | 30,2 | 33,9 | G.Z. |
| Nr. 4 | 29,4 | 28,8 | 26,9 | 29,3 | 32,5 | 33,2 | in Sek. |
| Nr. 5 | 31,2 | 29,5 | 26,9 | 26,9 | 27,8 | 28,4 | |
| Nr. 6 | 28,2 | 28,3 | 28,0 | 29,4 | 30,2 | 31,3 | |
| Nr. 7 | 29,7 | 29,7 | 28,1 | 27,9 | 28,9 | 29,9 | |
| Nr. 8 | 30,6 | 28,9 | 29,1 | 30,9 | 29,2 | 31,4 | |
| Nr. 9 | 34,7 | 29,5 | 28,1 | 29,3 | 29,5 | 31,0 | |
| Nr.10 | 35,2 | 30,1 | 27,4 | 28,8 | 31,4 | 33,2 | |

Beide Gerinnungszeiten waren also verlängert, durch das Serum II, das den höheren Antikörpertiter hatte, stärker als durch das Serum I . Die Bildungszeit war nach Zusatz von Serum I normal geblieben: 2 - 3 Minuten, während sie nach Zusatz des Serums II verlängert war, nämlich 2 - 5 Minuten.

Tab. 7 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von intakten Thrombozyten, die mit normalem Kaninchenserum 30 Min. lang bei 37° C inkubiert und danach durch Zentrifugieren vom Serum wieder befreit wurden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 1 | 16,2 | 14,4 | 16,6 | 18,1 | 19,2 | 20,2 | |
| Nr. 2 | 14,4 | 14,7 | 16,9 | 17,7 | 18,3 | 19,0 | |
| Nr. 3 | 15,6 | 14,1 | 15,5 | 17,7 | 19,9 | - | G.Zt. |
| Nr. 4 | 17,5 | 15,9 | 15,5 | 17,2 | 19,5 | 17,7 | in Sek. |
| Nr. 5 | 14,4 | 14,5 | 16,7 | 18,1 | 19,3 | 20,8 | |
| Nr. 6 | 14,3 | 14,2 | 15,8 | 17,5 | 17,7 | 17,9 | |
| Nr. 7 | 15,3 | 14,9 | 15,1 | 15,2 | 18,5 | 20,6 | |
| Nr. 8 | 15,8 | 13,5 | 14,1 | 17,6 | 18,1 | 19,4 | |
| Nr. 9 | 14,1 | 13,9 | 15,1 | 17,5 | 18,3 | 19,7 | |
| Nr.10 | 14,2 | 14,3 | 16,1 | 18,5 | 19,2 | 20,0 | |

Nach Inkubation intakter Thrombozyten mit normalem Kaninchenserum betrugen die kürzesten Gerinnungszeiten 14,4 $\pm$ 0,5 Sek. bei Bildungszeiten in der 2.-4. Minute. Beide Zeiten waren also nicht, bzw. nur geringfügig verändert. (s.Abb. 3)

c) Faktor-3-Aktivität intakter Thrombozyten, die vergleichsweise mit der $\gamma$-Globulinfraktion von zwei Antikörperseren und von normalem Kaninchenserum inkubiert wurden.

Wurde die Thrombozytensuspensionen mit der $\gamma$-Globulinfraktion vom Anti-Humanthrombozyten-Serum I inkubiert, so ergaben sich bei Bildungszeiten von 3 - 4 Minuten kürzeste Gerinnungszeiten von 20,4 $\pm$ 1,0 Sek.

Tab. 8 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von intakten Thrombozyten, die mit der $\gamma$-Globulinfraktion des Anti-Humanthrombozyten-Serums I 30 Min. bei 37° C inkubiert und danach vom Serum wieder befreit wurden

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr.1 | 23,4 | 21,0 | 20,6 | 22,3 | 24,1 | 25,6 | |
| Nr.2 | 22,8 | 20,5 | 19,5 | 21,5 | 23,7 | 25,2 | |
| Nr.3 | 24,5 | 21,2 | 21,5 | 23,7 | 25,2 | 26,7 | |
| Nr.4 | 24,6 | 20,7 | 19,6 | - | 24,8 | 25,3 | G.Zt. |
| Nr.5 | 18,9 | 18,6 | 24,5 | 25,5 | 27,8 | 28,2 | in Sek. |
| Nr.6 | 22,2 | 20,9 | 21,8 | 23,3 | 25,8 | 26,3 | |
| Nr.7 | 25,4 | 21,3 | 20,3 | 21,1 | 23,9 | 25,5 | |
| Nr.8 | 22,2 | 20,3 | 19,4 | 21,6 | 23,7 | 26,4 | |
| Nr.9 | 27,2 | 22,8 | 21,5 | 23,2 | 24,7 | 26,7 | |
| Nr.10 | 23,4 | 21,7 | 21,4 | 21,7 | 21,5 | 23,2 | |

Tab.9 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von intakten Thrombozyten, die mit der $\gamma$-Globulinfraktion des Anti-Humanthrombozyten-Serum II 30 Min. bei 37° C inkubiertund danach durch Zentrifugieren vom Serum wieder befreit wurden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr.1 | 24,5 | 22,5 | 21,3 | 22,7 | 23,6 | 24,6 | |
| Nr.2 | 24,3 | 22,0 | 22,1 | 24,1 | 23,7 | 25,4 | |
| Nr.3 | 26,0 | 21,0 | 20,9 | 20,5 | 24,9 | 28,1 | |
| Nr.4 | 22,6 | 21,4 | 20,8 | 21,7 | 20,6 | 22,3 | G.Zt. |
| Nr.5 | 23,0 | 21,6 | 20,3 | 23,7 | 22,4 | 22,4 | in Sek. |
| Nr.6 | 25,1 | 21,3 | 22,4 | 23,8 | 24,3 | 28,7 | |
| Nr.7 | 23,6 | 20,1 | 21,2 | 22,3 | 24,4 | 25,6 | |
| Nr.8 | 25,3 | 22,1 | 21,2 | 22,4 | 24,1 | 24,8 | |
| Nr.9 | 23,7 | 20,3 | 20,9 | 21,4 | 23,6 | 25,7 | |
| Nr.10 | 25,3 | 20,0 | 21,4 | 21,9 | 23,7 | 25,8 | |

Nach der Inkubation mit der $\gamma$-Globulinfraktion vom

Anti-Humanthrombozyten-Serum II wurden bei der Bildungszeit von 3-6 Minuten kürzeste Gerinnungszeiten von 20,8 ± 0,6 Sek. gemessen. Die Gerinnungszeiten waren also wieder verlängert, aber nicht so stark, wie nach Inkubation der Thrombozyten mit dem vollen Antikörperserum.

Bei den mit der γ-Globulinfraktion des normalen Kaninchenserums inkubierten Thrombozytensuspensionen betrugen die kürzesten Gerinnungszeiten 14,6 ± 0,5 Sek. bei Bildungszeiten von 2 - 4 Minuten. Beide Zeiten waren also auch hierbei nicht wesentlich gegenüber Normalwerten intakter Thrombozyten verändert. (s. Abb. 4)

Tab. 10 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von intakten Thrombozyten, die mit der γ-Globulinfraktion von normalem Kaninchenserum 30 min. lang bei 37° C inkubiert und danach vom Serum wieder befreit wurden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 1 | 14,8 | 15,3 | 15,9 | 16,7 | 16,6 | 18,2 | |
| Nr. 2 | 14,3 | 15,3 | 16,7 | 17,9 | 16,9 | 17,5 | |
| Nr. 3 | 14,3 | 15,4 | 15,2 | 17,3 | 17,8 | 18,3 | G.Zt. |
| Nr. 4 | 15,6 | 15,3 | 16,2 | 16,9 | 17,3 | 19,9 | in Sek |
| Nr. 5 | 14,7 | 15,1 | 15,7 | 17,1 | 17,8 | 19,0 | |
| Nr. 6 | 15,5 | 14,0 | 16,0 | 18,0 | 18,5 | 19,3 | |
| Nr. 7 | 14,1 | 15,4 | 16,1 | 16,3 | 16,0 | 17,1 | |
| Nr. 8 | 14,7 | 14,0 | 15,3 | 17,4 | 17,9 | 18,1 | |
| Nr. 9 | 17,3 | 15,7 | 16,7 | 16,3 | 17,3 | 18,6 | |
| Nr.10 | 15,1 | 15,3 | 14,4 | 15,7 | 17,4 | 18,3 | |

d) Faktor-3-Aktivität intakter Thrombozyten, die vergleichsweise mit der 1:4 Verdünnung von zwei Antikörperseren und von normalem Kaninchenserum inkubiert wurden.

Wurden die Thrombozytensuspensionen mit der 1:4 Verdünnung vom Anti-Humanthrombozytenserum I inkubiert, so ergaben sich kürzeste Gerinnungszeiten von 2o,3 ± 1,0 Sekunden bei Bildungszeiten von 3 Minuten. Nach Inkubation mit dem 1:4 verdünnten Anti-Humanthrombozyten-Serum II ließen sich bei Bildungszeiten von 3 - 4 Minuten kürzeste Gerinnungszeiten um 21,3 ± 0,7 Sekunden feststellen. Diese Gerinnungs-

Tab. 11 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von intakten Thrombozyten, die mit der 1:4 Verdünnung des Anti-Humanthrombozyten-Serums I 30 Min. bei 37° C inkubiert und danach durch Zentrifugieren vom Serum wieder befreit wurden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 1 | 23,4 | 2o,5 | 21,o | 22,8 | 23,7 | 25,6 | |
| Nr. 2 | 24,o | 21,7 | 22,7 | 24,6 | 24,9 | 26,6 | |
| Nr. 3 | 23,5 | 19,4 | 22,2 | - | 24,8 | 28,3 | G.Zt. |
| Nr. 4 | 22,1 | 19,o | 2o,8 | 21,1 | 25,5 | 25,6 | in Sek. |
| Nr. 5 | 22,1 | 19,6 | 21,8 | 21,7 | 23,0 | 25,6 | |
| Nr. 6 | 26,6 | 21,3 | 22,3 | 25,8 | 26,2 | 27,0 | |
| Nr. 7 | 23,3 | 19,1 | 2o,9 | 2o,o | 22,8 | 23,9 | |
| Nr. 8 | 23,7 | 21,4 | 21,5 | 22,2 | 25,1 | 26,7 | |
| Nr. 9 | 24,1 | 2o,1 | 2o,3 | 23,4 | 24,7 | 25,7 | |
| Nr.1o | 21,5 | 21,o | 22,1 | 23,7 | 24,2 | 26,4 | |

Tab.12 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von intakten Thrombozyten, die mit der 1:4 Verdünnung des Anti-Humanthrombozyten-Serums II 3o Minuten bei 37° C inkubiert und danach vom Serum wieder befreit wurden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 1 | 24,4 | 21,5 | 21,5 | 23,4 | 24,6 | 25,4 | |
| Nr. 2 | 26,1 | 22,3 | 22,4 | 23,o | 26,7 | 26,7 | |
| Nr. 3 | 26,2 | 2o,2 | 2o,4 | 21,8 | 24,3 | 27,1 | G.Zt. |
| Nr. 4 | 25,2 | 22,o | 23,2 | 23,6 | 24,8 | 26,1 | in Sek. |
| Nr. 5 | 22,5 | 2o,4 | 21,3 | 22,5 | 23,5 | 23,1 | |
| Nr. 6 | 24,8 | 2o,7 | 2o,8 | 22,7 | 22,9 | 24,5 | |
| Nr. 7 | 23,9 | 21,6 | 2o,8 | 22,4 | 23,9 | 24,6 | |
| Nr. 8 | 28,4 | 22,3 | 21,4 | 26,1 | 25,9 | 27,o | |
| Nr. 9 | 26,1 | 21,3 | 22,5 | 24,o | 25,9 | 27,1 | |
| Nr.10 | 25,2 | 22,1 | 22,3 | 24,o | 25,8 | 26,9 | |

zeiten und auch die Bildungszeiten entsprechen den Zeiten, die nach Inkubation der Thrombozyten mit der $\gamma$-Globulinfraktion der Antikörperseren erhalten wurden.

Bei den mit der 1:4 Verdünnung des normalen Kaninchenserums inkubierten Thrombozytensuspensionen waren Bildungszeiten mit 2 - 3 Minuten normal lang, während die kürzesten Gerinnungszeiten mit Werten um 14,0 $\pm$ 0,5 Sekunden geringfügig gegenüber unbehandelten Thrombozyten verlängert waren. (s. Abb. 5)

Tab. 13 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von intakten Thrombozyten, die mit der 1:4 Verdünnung des normalen Kaninchenserums 3o Minuten lang bei 37° C inkubiert und danach vom Serum wieder befreit wurden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 1 | 14,8 | 14,1 | 14,8 | 15,9 | 16,7 | 17,8 | |
| Nr. 2 | 17,8 | 15,3 | 14,5 | 16,7 | 16,9 | 18,1 | |
| Nr. 3 | 13,9 | 13,8 | 14,7 | 15,4 | 17,7 | 18,2 | G.Zt. |
| Nr. 4 | 13,7 | 14,7 | 16,2 | 15,7 | 16,9 | 17,5 | in Sek. |
| Nr. 5 | 13,7 | 14,4 | 15,2 | 16,7 | 16,9 | 17,8 | |
| Nr. 6 | 13,8 | 13,9 | 14,7 | 15,8 | 17,1 | 18,2 | |
| Nr. 7 | 14,3 | 14,2 | 15,0 | 16,2 | 17,4 | 18,5 | |
| Nr. 8 | 13,8 | 13,3 | 13,9 | 14,1 | 16,7 | 16,9 | |
| Nr. 9 | 14,9 | 13,7 | 14,0 | 15,4 | 15,3 | 16,4 | |
| Nr.10 | 15,3 | 14,7 | 14,9 | 15,6 | 16,4 | 17,9 | |

e) Faktor-3-Aktivitätswerte lysierter Thrombozyten, die vergleichsweise mit dem Anti-Humanthrombozyten-Serum, mit seiner $\gamma$-Globulinfraktion und mit seiner 1:4 Verdünnung inkubiert wurden.

Tab. 14 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von lysierten Thrombozyten, die mit dem Anti-Humanthrombozyten-Serum II 30 Minuten lang bei 37° C inkubiert wurden. Das Serum war aus dem Gemisch nicht wieder entfernt worden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 1 | 36,0 | 29,4 | 30,7 | 33,5 | - | 37,1 | |
| Nr. 2 | 28,4 | 26,0 | 30,3 | 32,5 | - | 34,9 | G.Zt. |
| Nr. 3 | 33,6 | 26,1 | 28,2 | 29,6 | 30,6 | 32,2 | in Sek. |
| Nr. 4 | 34,0 | 28,0 | 27,4 | 31,7 | 32,0 | 33,4 | |
| Nr. 5 | 36,0 | 27,2 | 29,2 | 31,3 | 33,1 | 34,3 | |
| Nr. 6 | 35,6 | 26,5 | 29,3 | 30,6 | 34,3 | 37,9 | |

Tab. 15 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von lysierten Thrombozyten, die mit der $\gamma$-Globulinfraktion des Anti-Humanthrombozyten-Serums II 30 Minuten bei 37° C inkubiert wurden. Das Serum war aus dem Gemisch nicht wieder entfernt worden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 1 | 21,9 | 20,3 | 20,9 | 23,8 | 25,1 | 26,3 | |
| Nr. 2 | 19,8 | 17,2 | 19,3 | 20,2 | 21,6 | 22,7 | G.Zt. |
| Nr. 3 | 17,8 | 16,7 | 23,3 | 25,4 | 25,5 | 25,9 | in Sek. |
| Nr. 4 | 20,7 | 19,9 | 20,3 | 22,5 | 26,4 | 26,7 | |
| Nr. 5 | 21,5 | 21,5 | 21,0 | 21,3 | 22,5 | 22,9 | |
| Nr. 6 | 21,2 | 20,8 | 20,7 | 23,5 | 24,1 | 25,6 | |

Wurden die lysierten Thrombozyten mit dem Anti-Humanthrombozyten-Serum inkubiert, so ergaben sich bei Bildungszeiten von 3 - 4 Minuten kürzeste Gerinnungszeiten um 27,1 ± 1,0 Sekunden. Beide Zeiten sind also verlängert gegenüber Normalthrombozyten, entsprechen aber den Zeiten, die bei intakten Thrombozyten nach Inkubation mit Anti-Humanthrombozyten-Serum gemessen wurden.

Tab. 16 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von lysierten Thrombozyten, die mit der 1:4 Verdünnung des Anti-Humanthrombozyten-Serums II 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert wurden. Das Serum war aus diesem Gemisch nicht wieder entfernt worden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 1 | 27,1 | 21,7 | 22,6 | 24,4 | - | 27,5 | |
| Nr. 2 | 23,6 | 20,4 | 23,9 | 22,1 | - | 25,4 | G.Zt. |
| Nr. 3 | 24,5 | 22,7 | 26,6 | 27,8 | 28,9 | 32,4 | in Sek. |
| Nr. 4 | 20,1 | 21,2 | 23,8 | 25,6 | 27,4 | 30,6 | |
| Nr. 5 | 21,3 | 23,5 | 23,6 | 26,8 | 27,3 | 28,6 | |
| Nr. 6 | 20,8 | 20,6 | 21,4 | 23,3 | 22,9 | 24,0 | |

Nach Inkubation lysierter Thrombozyten mit der γ-Globulinfraktion fanden sich kürzeste Gerinnungszeiten um 19,3 ± 1,5 Sekunden bei Bildungszeiten von 3 - 4 Minuten. Das entspricht ebenfalls den Befunden bei intakten Thrombozyten, die mit der γ-Globulinfraktion des Antikörperserums behandelt worden waren.

Wurden die lysierten Thrombozyten mit dem 1:4 verdünnten Anti-Humanthrombozyten-Serum inkubiert, so betrugen die kürzesten Gerinnungszeiten 21,1 ± 0,9 Sekunden bei Bildungszeiten von 2 - 3 Minuten. Auch diese Gerinnungszeiten sind gegenüber unbehandelten Thrombozyten verlängert, und zwar in gleichem Maße wie nach Inkubation intakter Thrombozyten mit 1:4 verdünntem Antikörperserum. (s. Abb. 6,7,8)

f) Faktor-3-Aktivitätswerte lysierter Thrombozyten, die mit normalem Kaninchenserum, mit seiner γ-Globulinfraktion und mit seiner 1:4 Verdünnung inkubiert wurden.

Bei den lysierten Thrombozyten, die mit normalem Kaninchenserum inkubiert wurden, fanden sich bei Bildungs-

zeiten von 2 - 3 Minuten kürzeste Gerinnungszeiten von 15,2 ± 0,6 Sekunden. Die Gerinnungszeiten sind also gegenüber normalen, unbehandelten lysierten Thrombozyten verlängert.

Tab. 17 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von lysierten Thrombozyten, die mit normalem Kaninchenserum 30 Minuten lang bei 37° C inkubiert wurden. Das Serum war aus dem Gemisch nicht wieder entfernt worden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr.1 | 15,4 | 17,6 | 18,3 | 20,8 | - | 21,9 | |
| Nr.2 | 20,4 | 15,9 | 17,2 | 17,8 | 19,7 | 20,6 | |
| Nr.3 | 14,1 | 16,7 | 17,8 | 17,6 | 19,3 | 20,9 | G.Zt. |
| Nr.4 | 14,7 | 15,5 | 18,3 | 18,8 | - | 19,9 | in Sek. |
| Nr.5 | 15,6 | 17,6 | 18,0 | 19,3 | 21,4 | 22,3 | |
| Nr.6 | 15,4 | 18,2 | 19,7 | 19,8 | 21,0 | 22,4 | |

Tab. 18 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von lysierten Thrombozyten, die mit der γ-Globulinfraktion des normalen Kaninchenserums 30 Minuten lang bei 37° C inkubiert wurden. Das Serum war aus dem Gemisch nicht wieder entfernt worden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr.1 | 12,2 | 12,5 | 13,1 | 14,0 | 14,2 | 15,0 | |
| Nr.2 | 11,9 | 13,2 | 14,1 | 14,8 | 15,0 | 14,9 | |
| Nr.3 | 13,6 | 11,0 | 12,7 | - | 13,0 | 13,3 | G.Zt. |
| Nr.4 | 12,1 | 14,0 | 15,1 | 14,9 | - | 15,8 | in Sek. |
| Nr.5 | 12,4 | 12,6 | 13,2 | 14,0 | 14,4 | 14,6 | |
| Nr.6 | 13,3 | 13,2 | 14,2 | 15,2 | 15,3 | 16,0 | |

Tab. 19 Thrombozytenfaktor-3-Aktivität von lysierten Thrombozyten , die mit der 1:4 Verdünnung des normalen Kaninchenserums 30 Minuten bei 37° C inkubiert wurden. Das Serum war aus dem Gemisch nicht wieder entfernt worden.

| Tbz-Suspension | Bildungszeit in Min. 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr.1 | 12,1 | 13,1 | 13,7 | 14,6 | 14,8 | 15,2 | |
| Nr.2 | 16,9 | 13,7 | 13,7 | 14,0 | 16,0 | 15,8 | |
| Nr.3 | 12,0 | 12,5 | 13,3 | 15,2 | 15,3 | 15,0 | G.Zt. |
| Nr.4 | 11,6 | 13,5 | 16,1 | 14,9 | 15,4 | 15,6 | in Sek. |
| Nr.5 | 11,5 | 11,8 | 13,4 | 14,6 | 15,1 | 16,3 | |
| Nr.6 | 15,9 | 13,6 | 14,0 | 14,3 | - | 16,0 | |

Lysierte Thrombozyten, die mit der γ-Globulinfraktion

von normalem Kaninchenserum behandelt wurden, zeigten kürzeste Gerinnungszeiten von 12,1 ± 0,7 Sekunden bei Bildungszeiten in der 2.- 3. Minute. Wurden sie mit der 1:4 Verdünnung des normalen Kaninchenserums inkubiert, so betrugen die kürzesten Gerinnungszeiten 12,8 ± 1,0 Sekunden bei Bildungszeiten in der 2. - 3. Minute. Sowohl durch die γ-Globulinfraktion als auch durch die 1:4 Verdünnung des antikörperfreien Kaninchenserums erfolgt also nur eine geringe Verlängerung der Gerinnungszeiten.

Zur besseren Übersicht sind in der Tabelle 20 die Mittelwerte der 10 bzw. 6 kürzesten Gerinnungszeiten und die dazugehörigen Plasmathrombokinase-Bildungszeiten zusammengestellt. Außerdem sind die Befunde aus allen Versuchsgruppen in der graphischen Darstellung (Abb. 1 - 8) wiedergegeben. Aus den Werten und Kurven geht deutlich die unterschiedliche Faktor-3- bzw. Plasmathrombokinase-Aktivität der einzelnen Versuchsansätze hervor.

Tab. 20 Zusammenstellung der Ergebnisse

| | Bildungszeit in Min. | Gerinnungszeit in Sek. |
|---|---|---|
| **I. Faktor-3-Aktivitätsbestimmung normaler Thrombozyten** | | |
| Tab. 1 Intakte Thrombozyten | 2 - 4 | 13,1 ± 0,7 |
| Tab. 2 Lysierte Thrombozyten | 1 - 3 | 11,1 ± 0,9 |
| **II. Faktor-3-Aktivitätsbestimmung nach Inkubation mit Antikörpern** | | |
| a) Intakte Thrombozyten mit Antikörper-Kaninchenserum I | | |
| Tab. 3 ohne Abwarten einer Inkubationszeit | 2 - 4 | 18,9 ± 0,6 |
| Tab. 4 nach 30 Min. Inkubation bei 37° C | 2 - 4 | 25,1 ± 0,8 |
| b) Intakte Thrombozyten 30 Min. inkubiert bei 37° C mit Kaninchenserum | | |
| Tab. 5 Antikörper-Kaninchenserum I | 2 - 4 | 24,5 ± 0,7 |
| Tab. 6 Antikörper-Kaninchenserum II | 2 - 5 | 28,2 ± 0,9 |
| Tab. 7 normales Kaninchenserum | 2 - 4 | 14,4 ± 0,5 |
| c) Intakte Thrombozyten 30 Min. inkubiert mit der γ-Globulinfraktion von Kaninchenserum | | |
| Tab. 8 γ-Globulinfraktion des Antikörper-Kaninchenserums I | 3 - 4 | 20,4 ± 1,0 |
| Tab. 9 γ-Globulinfraktion des Antikörper-Kaninchenserum II | 3 - 6 | 20,8 ± 0,6 |
| Tab.10 γ-Globulinfraktion des normalen Kaninchenserum | 2 - 4 | 14,6 ± 0,5 |
| d) Intakte Thrombozyten 30 Min. inkubiert mit 1:4 verdünntem Kaninchenserum | | |
| Tab.11 Mit 1:4 verdünntem Antikörper-Kaninchenserum I | 3 | 20,3 ± 1,0 |
| Tab.12 Mit 1:4 verdünntem Antikörper-Kaninchenserum II | 3 - 4 | 21,3 ± 0,7 |
| Tab.13 Mit 1:4 verdünntem normalen Kaninchenserum | 2 - 4 | 14,0 ± 0,5 |
| e) Lysierte Thrombozyten 30 Min. inkubiert mit Antikörper-Kaninchenserum II | | |
| Tab.14 Mit Antikörper-Kaninchenserum II | 3 - 4 | 27,1 ± 1,0 |
| Tab.15 Mit der γ-Globulinfraktion des Antikörper-Kaninchenserums II | 3 - 4 | 19,3 ± 1,5 |
| Tab.16 Mit 1:4 verdünntem Antikörper-Kaninchenserum II | 2 - 3 | 21,1 ± 0,9 |
| f) Lysierte Thrombozyten 30 Min. inkubiert mit normalem Kaninchenserum (=antikörperfrei) | | |
| Tab.17 Mit normalem Kaninchenserum | 2 - 3 | 15,2 ± 0,6 |
| Tab.18 Mit der γ-Globulinfraktion des normalen Kaninchenserums | 2 - 3 | 12,1 ± 0,7 |
| Tab. 19Mit 1:4 verdünntem normalen Kaninchenserum | 2 - 3 | 12,8 ± 1,0 |

# Thrombozytenfaktor-3-Aktivitätskurven

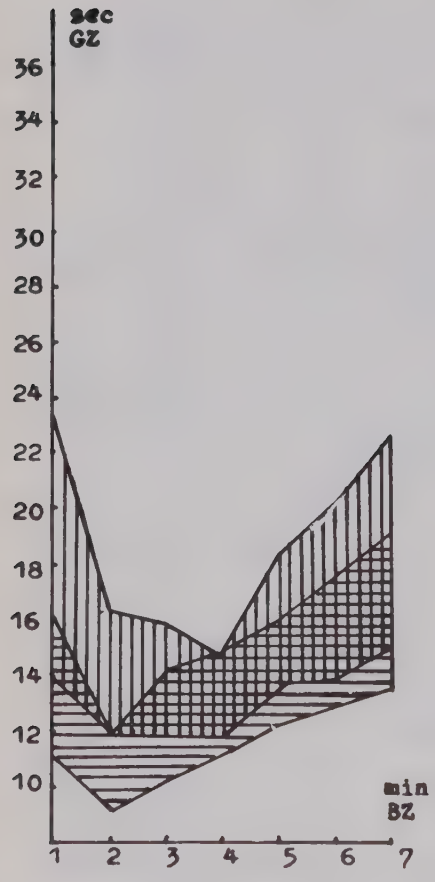


Abb.1 (Tab. 1 ; 2)

Normal Tbz.

Intakte Tbz.

Lysierte Tbz.

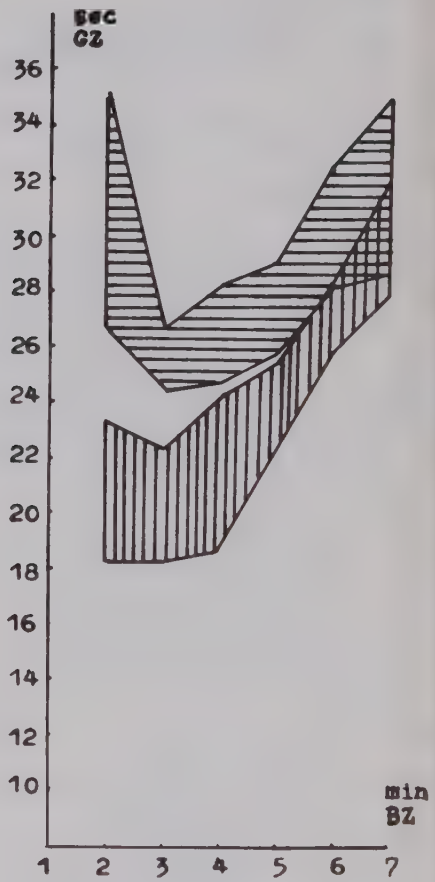


Abb.2 (Tab.3;4)

Intakte Tbz. mit Antikörper-KS I

nicht inkubiert

30 Min. inkubiert bei 37°C

Erklärung der Abkürzungen

BZ = Bildungszeit der Plasmathrombokinase

GZ = Gerinnungszeit

KS = Kaninchenserum

Tbz= Thrombozyten

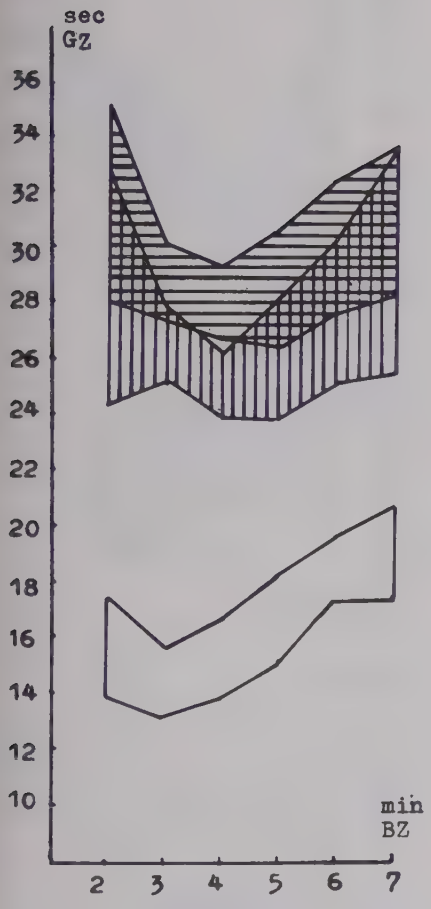


Abb.3 (Tab.5;6;7)

Intakte Tbz.
30 Min. inkubiert
mit KS

Antikörper-KS I

Antikörper-KS II

normales KS

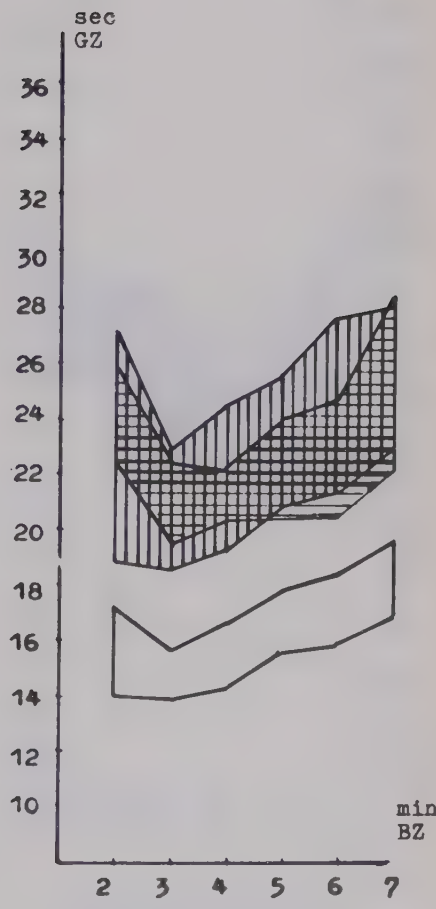


Abb.4 (Tab.8;9;10)

Intakte Tbz. 30 Min.
inkubiert mit der
Gammaglobulinfraktion

Gammaglobulinfraktion
des Antikörper-KS I

Gammaglobulinfraktion
des Antikörper-KS II

Gammaglobulinfraktion
des normalen KS

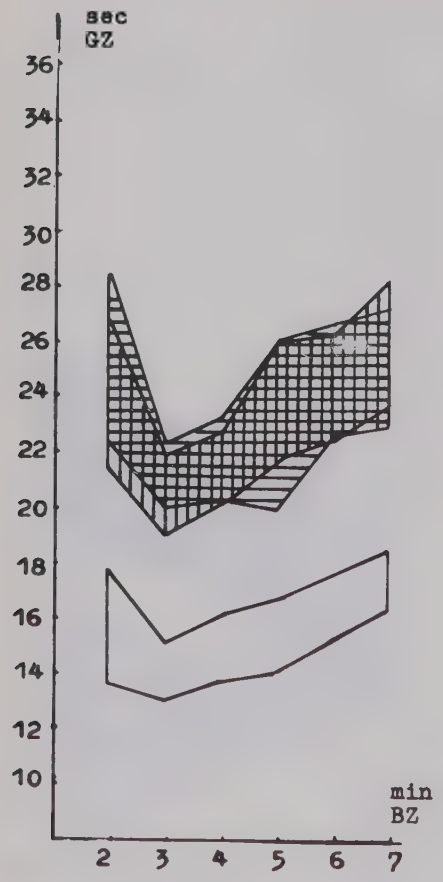


Abb.5 (Tab.11;12;13)

Intakte Tbz. 30 Min. inkubiert mit 1:4 verdünntem KS

1:4 verdünntes Antikörper-KS I

1:4 verdünntes Antikörper-KS II

1:4 verdünntes normales KS

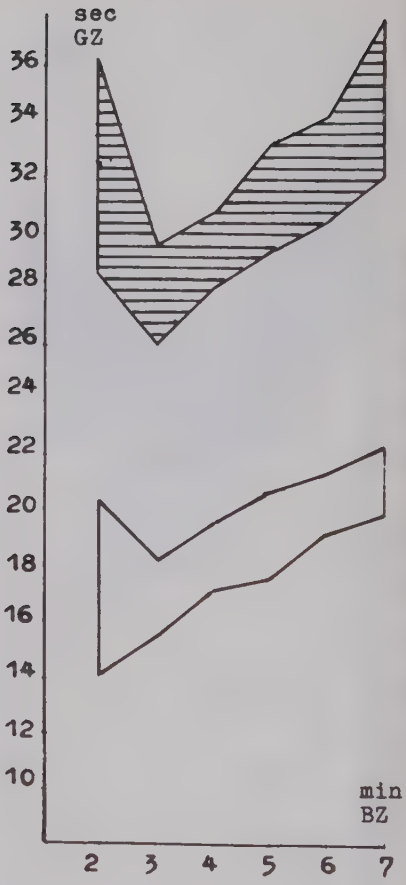


Abb.6 (Tab.14;17)

Lysierte Tbz 30 Min. inkubiert mit KS

Antikörper-KS II

normales KS

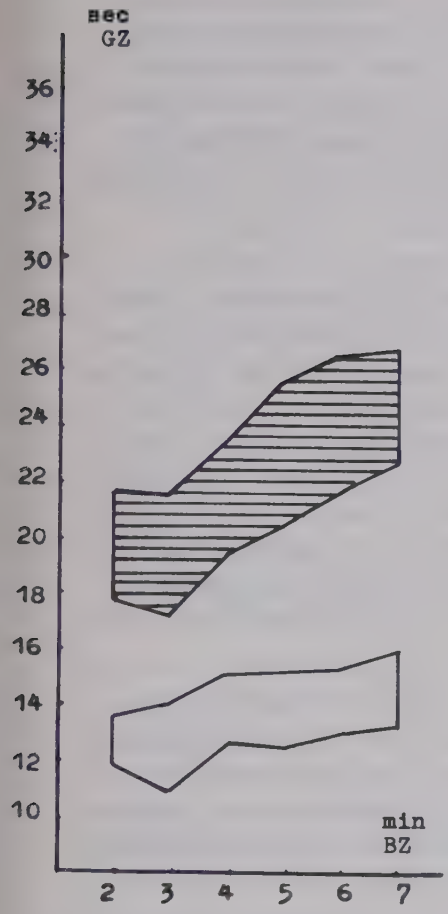


Abb.7 (Tab.15;18)

Lysierte Tbz.
30 Min. inkubiert
mit der
Gammaglobulinfraktion

Gammaglobulinfraktion des Antikörper-KS II

Gammaglobulinfraktion des normalen KS

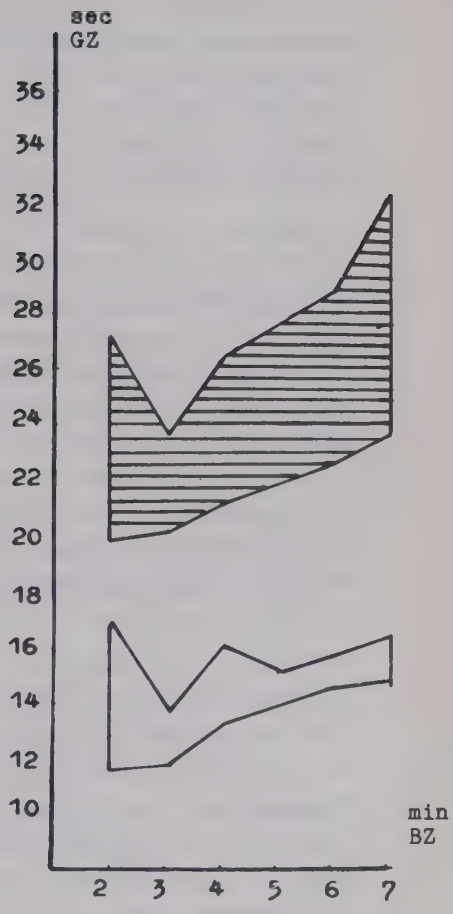


Abb.8 (Tab.16;19)

Lysierte Tbz.
30 Min. inkubiert
mit 1:4 verdünntem KS

1:4 verdünntes Antikörper-KS II

1:4 verdünntes, normales KS

# DISKUSSION

Bei der chronischen idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (Morbus WERLHOF) gelang es zahlreichen Untersuchern gegen die Thrombozyten gerichtete autoaggressive Substanzen im Blut dieser Patienten nachzuweisen. Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen können diese an den Thrombozyten in der Blutbahn, an den Megakaryozyten sowie am Kapillarendothel angreifen.

In letzter Zeit wurde nun von mehreren Autoren bei dieser Erkrankung neben der Thrombozytopenie auch eine Störung der Gerinnungsfunktion der Thrombozyten gefunden, die sich als Thrombozytenfaktor-3-Aktivitätsminderung im Plasmathrombokinase-Bildungstest zeigte, und sich damit als eine thrombozytär-bedingte Blutthrombokinase-Bildungsstörung erweist. Dieser Befund ließ sich auch experimentell erheben: WENDT konnte in unserem Laboratorium nachweisen, daß nach Inkubation normaler Thrombozyten mit echten gegen sie gerichteten Antikörpern (Anti-Humanthrombozyten-Serum vom Kaninchen) regelmäßig eine echte Faktor-3-Aktivitätsminderung auftritt.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Fortsetzung der Studien von WENDT ebenfalls die Wirkung von Antikörperseren auf die Faktor-3-Aktivität normaler menschlicher Thrombozyten untersucht, wobei folgende weitere Fragen geklärt werden sollten, um die Faktor-3-Aktivitätsminderung durch Thrombozyten-Antikörper näher zu charakterisieren:

I. Ist der Grad der Faktor-3-Aktivitätsminderung abhängig von der Inkubationszeit der Thrombozytensuspension mit dem Antikörperserum?

II. Hat die Stärke des Antikörpertiters Einfluß auf das Ausmaß der Faktor-3-Aktivitätsminderung?

III. Läßt sich durch die γ-Globulinfraktion des Antikörperserums eine gleichstarke Faktor-3-Aktivitäts-

minderung erzielen ? Ist also die Faktor-3-Aktivitätsminderung durch das Antikörperserum eine echte Antikörperwirkung und nicht etwa nur durch die Wirkung artfremden Serums bedingt ?

IV. Besteht ein Unterschied der Antikörperwirkung auf intakte und mechanisch lysierte Thrombozyten, d.h. ist diese Faktor-3-Aktivitätsminderung Folge einer gestörten Faktor-3-Freisetzung aus den Thrombozyten oder ein echter Faktor-3 Mangel ?

**Dazu** wurde im Plasmathrombokinase-Bildungstest die Faktor-3-Aktivität intakter und mechanisch lysierter Humanthrombozyten ,die mit Antihumanthrombozytenserum bzw. seiner γ-Globulinfraktion inkubiert worden waren,vergleichend geprüft und den Faktor-3-Aktivitätswerten von nicht behandelten intakten und lysierten Normalthrombozyten gegenübergestellt.

I. Ist der Grad der Faktor-3-Aktivitätsminderung abhängig von der Inkubationszeit der Thrombozytensuspension mit dem Antikörperserum ?

Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten war die Faktor-3-Aktivität deutlich vermindert ( s. Abb. 2 ). Im Vergleich dazu wurde der Plasmathrombokinase-Bildungstest sofort nach dem Zusatz des Antikörperserums zur Thrombozytensuspension , also ohne längere Inkubationszeit abzuwarten , durchgeführt. Dabei war die Faktor-3-Aktivitätsminderung zu Beginn des Testes noch gering ; sie nahm erst im weiteren Verlauf des Versuches in immer stärkeren Maße zu, als Folge der so immer länger werdenden Inkubationszeit der Thrombozyten und Antikörper im Ansatz I.Die Faktor-3-Aktivitätsminderung erreichte aber nicht das Ausmaß, das nach 30 Minuten langer Inkubationszeit gemessen worden war . Somit ergibt sich,daß bei Seren mit niederem Antikörpertiter die Faktor-3-inaktivierende Wirkung erst nach ausreichender Inkubationszeit deutlich wird. Dieses Verhalten ist also bei der

Prüfung eines Serums auf Thrombozyten-Antikörper zu berücksichtigen.

II. Hat die Stärke des Antikörpertiters Einfluß auf das Ausmaß der Faktor-3-Aktivitätsminderung?

Zunächst konnte die von WENDT gefundene Faktor-3-Aktivitätsminderung intakter Thrombozyten nach Inkubation mit Antihumanthrombozytenserum bestätigt werden. Die Thrombozyten wurden mit zwei Antikörper-Kaninchenseren inkubiert, von denen eines (Serum I) einen niederen, das andere (Serum II) einen höheren Antikörpertiter aufwies. In beiden Versuchsreihen trat eine beträchtliche Faktor-3-Aktivitätsminderung auf. Sie war jedoch deutlich stärker bei Verwendung des höher-titrigen Serum II. Vergleichsweise wurden Thrombozyten auch mit normalem, d.h. antikörperfreiem Kaninchenserum inkubiert. Dabei zeigte sich nur eine geringfügige Verminderung der Faktor-3-Aktivität, die bei weitem nicht das Ausmaß der durch Antikörperseren hervorgerufenen Aktivitätsminderung erreichte. Es ist also anzunehmen, daß hier eine unspezifische Wirkung des artfremden Serums auf die Thrombozyten vorlag. Wie beträchtlich die oben beschriebene Antikörperwirkung im Gegensatz zu dieser unspezifischen Hemmwirkung ist, erhellt sich daraus, daß durch die Gegenwart von Thrombozyten-Antikörperseren die Faktor-3-Aktivität nahezu vollständig ausgeschaltet wird. Ersetzt man nämlich im Plasmathrombokinase-Bildungstest die Thrombozytensuspension durch physiologische NaCl-Lösung, so erhält man den gleichen Grad der Thrombokinase-Bildungsstörung wie mit Antikörper-inkubierten Thrombozytensuspensionen.

So ergibt sich, daß die Verminderung der Faktor-3-Aktivität von der Höhe des Antikörpertiters abhängig ist. Um aus der Faktor-3-Aktivität der Thrombozyten auf die Gegenwart von Thrombozyten-Antikörpern schließen zu können, ist also neben einer ausreichend

langen Inkubationszeit auch ein möglichst hoher Antikörpertiter notwendig.

III. Läßt sich durch die γ-Globulinfraktion des Antikörperserums eine gleichstarke Faktor-3-Aktivitätsminderung erzielen?

Wenn es sich bei den autoaggressiven Substanzen, die eine Faktor-3-Aktivitätsminderung bewirken, tatsächlich um Antikörper handeln sollte, müßten diese in der γ-Globulinfraktion des Antihumanthrombozytenserums enthalten sein. Die Isolierung der γ-Globulinfraktion führten wir nach der Methode von HORESJSI und SMETANA durch. Dabei erfolgte eine 1:4 Verdünnung des Serums, also auch eine Verringerung des Antikörpertiters. Um die Wirkung der γ-Globulinfraktion des Antihumanthrombozytenserums auf die Faktor-3-Aktivität beurteilen zu können, mußten wir demnach vergleichsweise Versuche mit entsprechend verdünntem Antihumanthrombozytenserum durchführen (1:4 Verdünnung mit NaCl-Lösung). Die Versuchsansätze mit der γ-Globulinfraktion und der 1:4 Verdünnung des Antihumanthrombozytenserums zeigten trotz dieser Antikörpertiter-Verringerung immer noch eine erhebliche Verminderung der Faktor-3-Aktivität, während Ansätze mit der γ-Globulinfraktion eines normalen antikörperfreien Kaninchenserums die gleiche geringfügig veränderte Aktivität ergaben, wie sie nach Inkubation mit normalem Kaninchen-Vollserum gefunden wurde. Die γ-Globulinfraktion des Antihumanthrombozytenserums bewirkte also die gleiche Verminderung der Faktor-3-Aktivität wie das im entsprechenden Verhältnis verdünnte Antikörperserum.

Die Hemmwirkung des 1:4 verdünnten Antihumanthrombozytenserums und seiner γ-Globulinfraktion auf die Faktor-3-Aktivität scheint somit der Ausdruck einer direkten Antikörperwirkung auf den Faktor 3 zu sein, vorausgesetzt, daß sich keine unspezifischen Hemmkörper in der γ-Globulinfraktion befinden.

IV. Besteht ein Unterschied der Antikörperwirkung auf intakte und mechanisch lysierte Thrombozyten?

Alle Untersuchungen wurden sowohl mit intakten wie mit lysierten Thrombozyten durchgeführt um festzustellen, ob es sich um einen echten Mangel an Faktor 3 oder nur um eine Freisetzungsstörung des Faktors 3 handelt, wie bei der konstitutionellen Thrombopathie v. WILLEBRAND-JÜRGENS. Läßt sich die Faktor-3-Aktivitätsminderung sowohl bei intakten wie auch bei lysierten Thrombozyten nachweisen, so handelt es sich um einen echten Mangel der Faktor-3-Aktivität. Ist die Faktor-3-Aktivitätsminderung jedoch nur mit intakten und nicht mit lysierten Thrombozyten nachweisbar, so liegt eine Freisetzungsstörung des Faktors vor. Bei unseren Versuchen führte die In_kubation mit Antihumanthrombozytenseren sowohl bei intakten wie auch bei lysierten Thrombozyten zu einer Verminderung der Faktor-3-Aktivität. Diese experimentellen Befunde unterscheiden sich damit deutlich von der bei der konstitutionellen Thrombopathie v. WILLEBRAND-JÜRGENS beobachteten Thrombozytenfunktionsstörung.

Als Ergebnis unserer Experimente läßt sich somit folgendes feststellen: Die Inkubation von Thrombozytensuspensionen mit Antihumanthrombozytenseren führt zu einer Faktor-3-Aktivitätsminderung, wobei der Grad der Verminderung der Inkubationszeit und der Stärke des Antikörpertiters paralell geht. Die bei intakten und lysierten Thrombozyten völlig gleichsinnig auftretende Hemmwirkung weist auf einen echten Mangel an Faktor 3 hin und schließt eine Freisetzungsstörung des Faktors aus. Da die Aktivitätsminderung in gleicher Weise durch die isolierte $\gamma$-Globulinfraktion des Antihumanthrombozytenserums hervorgerufen wird, ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß es sich bei der Hemmwirkung um eine echte Antikörperwirkung handelt, wobei der Faktor 3 direkt angegriffen wird und so die Thrombozyten in ihrer Gerinnungsfunktion weitgehend ausgeschaltet werden.

# ZUSAMMENFASSUNG

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Faktor-3-Aktivität menschlicher Normal-Thrombozyten im Plasmathrombokinase-Bildungstest nach Zugabe echter Antikörper (Anti-Humanthrombozyten-Serum vom Kaninchen) unter verschiedenen Versuchsbedingungen geprüft. Die Ursache der dabei auftretenden Faktor-3-Aktivitätsminderung sollte näher geklärt werden. Zunächst ging es um die Frage, ob die Inkubationszeit (Dauer der Einwirkung des Antikörperserums auf die Thrombozyten) und die Höhe des Antikörper-Titers des Kaninchenserums das Ausmaß der Antikörperwirkung beeinflussen. Dann wurde untersucht, ob die Faktor-3-Aktivitätsminderung auch durch die $\gamma$-Globulinfraktion des Antikörperserums hervorgerufen wird. Diese Versuche wurden sowohl mit intakten wie auch mit lysierten Thrombozyten durchgeführt, um zu prüfen, ob es sich um eine Freisetzungsstörung oder um eine echte Blockierung des Faktors 3 handelt.

Es zeigte sich, daß bei intakten wie auch bei lysierten Thrombozyten durch Inkubation mit Antikörperseren eine Faktor-3-Aktivitätsminderung hervorgerufen wird. Der Grad der Hemmwirkung hängt dabei ab von der Höhe des Antikörper-Titers und von der Dauer der Inkubationszeit. Mit der $\gamma$-Globulinfraktion des Antikörperkaninchenserums (=Antikörperfraktion) wurden die gleichen Ergebnisse erzielt. Wir halten es so für naheliegend, in der Hemmwirkung des Anti-Humanthrombozyten-Serums vom Kaninchen auf die Faktor-3-Aktivität normaler Thrombozyten eine echte Antikörperwirkung zu sehen.

# L I T E R A T U R


1. ACKROYD, J.F.: Clin. Sci. 7,249 (1948)
2. BEDSON, S.PH.: J. Path. Bact. 25, 94 (1922)
3. BERGSAGEL, D. E.: Brit. J. Haemat. 2, 130 (1956)
4. BIGGS, R. u. DOUGLAS, A.S.: J. Clin. Path. 6, 23 (1953)
5. BONNIN, J.A.: Brit. J. Haemat. 2, 160 (1956)
6. BONNIN, J.A.: Blood, 12,726 (1957)
7. BONNIN, J.A.: Austr. Ann. Medic. 6, 196 (1957)
8. BRAUNSTEINER, H.: Thrombopathie und Thrombasthenie Urban u. Schwarzenberg, Wien u.Innsbruck (19
9. DÖRKEN, H. u. LANDBECK, G.: Klin. Wschr. 33, 741 (1955)
10. EVANS, R.S. u. DUANE, R.T.: Blood 4, 1196 (1949)
11. FISCHER, K. u. LANDBECK, G.: Klin. Wschr. 562 (1959)
12. FISCHER, K. u. LANDBECK, G.:Europ. Haemat. Kongr. Kopenhagen 19
13. FRANK, E.: Handbuch der Krankheiten des Blutes und der blutbildenden Organe 2, 289 (1925)
14. HARRINGTON,W.J., SPRAGUE,C., MOORE,C.V., DOUBACH, R.: Ann. Int. Med. 38, 433 (1953)
15. HOREJSI, J. u. SMETANA, R.: Acta Med. Scand. 160,65 (1956)
16. JÜRGENS,R. u. HIEPLER,E.: 64.Tgg. Dtsch.Ges. Inn.Med. Wiesbaden 1958
17. KOLLER,F., B_AER,P., GEIGER,M.: Acta Haemat. 18, 33 (1957)
18. LANDBECK,G. u. FISCHER, K.: 66. Tgg. Dtsch.Ges. Inn.Med. 1959
19. LANDBECK,G. u. SAUER,H.: Rhein.-Westf.Ges. Inn.Med. 1958
20. LANDBECK,G. u. UATHAVIKUL,P.: Klin.Wschr. 37, 227, (1959)
21. LÜSCHER, E.F.: Schweiz. Med. Wschr. 86, 345 (1956)
22. MIESCHER,P. u. VORLAENDER,K.O.: Immunpathologie in Klinik und Forschung. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1957
23. SCHÄFER,K.H., FISCHER,K. u. LANDBECK,G.: Dtsch.Med.Wschr. 83, 6 (1958)
24. SCHÄFER,K.H., LANDBECK,G. u.FISCHER,K.: Dtsch.Med. Wschr. 85,78 (1960)
25. STEFANINI,M. u. DAMESHEK,W.: The Haemorrhagic Disorders Grune & Stratton New York/London 1955

26. WITTE,P.: Brit. J. Haem. 2, 374 (1956)

27. WENDT,U.: Inaug.-Diss. Hamburg 1959

Herrn Prof. Dr. Schäfer danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, an seiner Klinik die Experimente durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Landbeck, dessen Rat und Hilfe ich bei der Durchführung der Arbeit jederzeit in Anspruch nehmen durfte.

Lebenslauf

Am 22. Oktober 1933 wurde ich als Sohn des Pastors Gerhard Tergau und seiner Ehefrau Anne, geb. Engelbrecht, in Münchehagen, Kreis Nienburg, geboren. Meine Schulzeit begann in der Volksschule am Heimatort. Von 1944 bis 1954 besuchte ich - mit einjähriger Unterbrechung nach Kriegsende - die Oberschule in Stadthagen. An dieser Schule legte ich am 5.3.1954 die Reifeprüfung ab. Das Medizinstudium begann ich in Göttingen. Dort bestand ich nach 5 Semestern das Physikum. Daraufhin studierte ich zunächst 2 Semester lang in Heidelberg. Seit dem 8. Semester war ich in Hamburg. Hier bestand ich am 8. Dezember 1960 das medizinische Staatsexamen.